

#5/AR
07/28/98

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)	Docket No.: Ariyasu=1
Toshio ARIYASU et al.)	Art Unit: 1643
Serial No.: 09/063,778)	Examiner:
Filed: April 22, 1998)	July 20, 1998
For: HEDGEHOG PROTEIN)	Washington, D.C.

REQUEST FOR PRIORITY

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

In accordance with the provisions of 37 CFR 1.55 and the requirements of 35 USC 119, there is filed herewith a certified copy of:

Japan	Appl. No.: 121578	Filed: April 25, 1997.
Japan	Appl. No.: 117873	Filed: April 14, 1998.

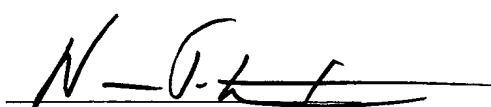
It is respectfully requested that applicant be granted the benefit of the priority date of the foreign application.

Respectfully submitted,

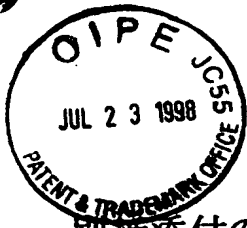
BROWDY AND NEIMARK, P.L.L.C.
Attorneys for Applicant

RECEIVED
JUL 21 1998
GROUP 1000

By:


NORMAN J. LATKER
Reg. No. 19,963

Telephone No.: (202) 628-5197
Facsimile No.: (202) 737-3528
Enclosures
NJL:lw



日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 7 年 4 月 2 5 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9 年特許願第 1 2 1 5 7 8 号

出 願 人

Applicant (s):

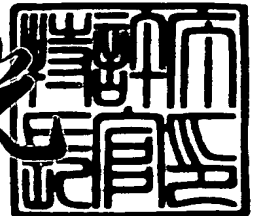
株式会社林原生物化学研究所

JUL 24 1998
GROUP 1800

1 9 9 8 年 5 月 2 9 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平 10-3041792

【書類名】 特許願

【整理番号】 10054801

【提出日】 平成 9年 4月25日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C07K 14/52
C12N 15/19
C07K 16/24

【発明の名称】 ヘッジホッグ蛋白質

【請求項の数】 18

【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市大福4 2 7 番地の2
【氏名】 有安 利夫

【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市桑野5 2 5 番地の3
【氏名】 中村 修治

【発明者】
【住所又は居所】 岡山県岡山市津島西坂1 丁目2 番3 4 号
【氏名】 折田 薫三

【特許出願人】
【識別番号】 000155908
【郵便番号】 700
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1 丁目2 番3 号
【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所
【代表者】 林原 健

【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヘッジホッグ蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ蛋白質。

【請求項2】 配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそのアミノ酸配列におけるアミノ酸の1又は複数が置換、付加及び／又は欠失されたアミノ酸配列を含有する請求項1に記載のヘッジホッグ蛋白質。

【請求項3】 ヒト細胞に由来する請求項1又は2に記載のヘッジホッグ蛋白質。

【請求項4】 ヒト由来の樹立細胞株ARH-77(ATCC CRL1621)に由来する請求項1、2又は3に記載のヘッジホッグ蛋白質。

【請求項5】 請求項1乃至4に記載のヘッジホッグ蛋白質をコードするDNA。

【請求項6】 配列表における配列番号2に示す塩基配列又はその塩基配列に相補的な塩基配列を含有する請求項5に記載のDNA。

【請求項7】 遺伝子の縮重に基づき、コードするアミノ酸配列を変えることなく塩基の1又は複数を他の塩基で置換した請求項5又は6に記載のDNA。

【請求項8】 自律複製可能なベクターに挿入された請求項5、6又は7に記載のDNA。

【請求項9】 適宜の宿主に導入された請求項5、6、7又は8に記載のDNA。

【請求項10】 請求項1乃至4に記載のヘッジホッグ蛋白質を認識するモノクローナル抗体。

【請求項11】 ヒト由来のソニック・ヘッジホッグ蛋白質をも認識する請求項10に記載のモノクローナル抗体。

【請求項12】 請求項1乃至4に記載のヘッジホッグ蛋白質を認識するモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ。

【請求項13】 請求項1乃至4に記載のヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAを発現させる工程と、生成したヘッジホッグ蛋白質を採取する工程とを含ん

でなるヘッジホッグ蛋白質の製造方法。

【請求項14】形質転換体を培養することによりDNAを発現させる請求項13に記載のヘッジホッグ蛋白質の製造方法。

【請求項15】生成したヘッジホッグ蛋白質を塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び／又は等電点電気泳動により採取する請求項13又は14に記載のヘッジホッグ蛋白質の製造方法。

【請求項16】生成したヘッジホッグ蛋白質を、モノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製又は採取する請求項13、14又は15に記載のヘッジホッグ蛋白質の製造方法。

【請求項17】請求項1乃至4に記載のヘッジホッグ蛋白質を認識するモノクローナル抗体を用いてヒト由来のヘッジホッグ蛋白質を検出する蛋白質の検出方法。

【請求項18】モノクローナル抗体が放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識されている請求項17に記載の蛋白質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、新規なヘッジホッグ蛋白質、とりわけ、ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ蛋白質に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ヘッジホッグ (hedgehog) 遺伝子は、ニュスライン・フォルハルト (Nüsslein-Volhard) ら、『ネイチャー (Nature)』、第287巻、795乃至801頁 (1980年) に記載されているように、ショウジョウバエの1種であるドロソフィラ・メラノガスター (*Drosophila melanogaster*) において胚及び幼虫の発生・分化時の正常な

形態形成に極めて重要な役割を果たす遺伝子として遺伝学的手法により見出された。ジェー・ジェー・リー (J. J. Lee) らは、『セル (Cell)』、第71巻、33乃至50頁 (1992年) に、当該遺伝子の塩基配列を示し、その発現産物であるヘッジホッグ蛋白質のアミノ酸配列を推測した。その後、哺乳類を含む脊椎動物に由来する当該遺伝子の相同体 (以下、ショウジョウバエ以外の生物種に由来するヘッジホッグの相同体も、単に「ヘッジホッグ」という。) がいくつか単離された。その結果、脊椎動物においては、ショウジョウバエの場合とは異なり、ヘッジホッグ遺伝子は多重遺伝子族を形成しており、それらが独自の役割を果たして、正常に形態が形成されると推測されるに至っている。

【0003】

例えば、マウス由来のヘッジホッグ遺伝子は、ワイ・エシェラード (Y. Echeillard) ら、『セル』、第75巻、1417乃至1430頁 (1993年) に記載のように、現在までに、互いに塩基配列や生体内での発現様式の異なる、ソニック・ヘッジホッグ (Sonic hedgehog)、インディアン・ヘッジホッグ (Indian hedgehog) 及びデザート・ヘッジホッグ (Desert hedgehog) と呼称される3種の遺伝子が確認されている。これに対してヒトの場合は、ヴィ・マリーゴ (V. Marigo) ら、『ゲノミクス (GENOMICS)』、第28巻、44乃至51頁 (1995年) に記載の、ソニック・ヘッジホッグ及びインディアン・ヘッジホッグと呼称される2種の遺伝子が確認されているのみであり、しかも、その発現様式や発現産物の機能等に関して得られている知見は甚だ少ない。以上のことから、ヒト由来の新規なヘッジホッグ遺伝子並びにその発現産物である新規なヘッジホッグ蛋白質は、ヒトの先天的形態異常の発症機序の解明や、その治療・診断方法の確立など、科学的見地のみならず医学的見地からも重要視され、確立が待ち望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

斯かる状況に鑑み、この発明の第一の課題は、ヒト由来の新規なヘッジホッグ蛋白質を提供することにある。

【0005】

この発明の第二の課題は、斯かるヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAを提供することにある。

【0006】

この発明の第三の課題は、斯かるヘッジホッグ蛋白質を認識するモノクローナル抗体を提供することにある。

【0007】

この発明の第四の課題は、斯かるヘッジホッグ蛋白質の製造方法を提供することにある。

【0008】

この発明の第五の課題は、斯かるヘッジホッグ蛋白質の検出方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、これらの課題を解決すべく、先ず、種々のヒト由来の樹立細胞株より得たRNAを鋳型に用い、ワイ・エシェラードらが報告し、米国国立予防衛生研究所作成の核酸データベース『GenBank』にアクセス番号『X76292』を付して登録されている、マウス由来のデザート・ヘッジホッグ遺伝子の塩基配列に基づき化学合成して得たオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、通常のRT-PCR法を適用して、当該遺伝子の相同体を発現するヒト細胞株を鋭意検索した。その結果、ヒト形質細胞白血病由来の樹立細胞株ARH-77 (ATCC CRL1621) を含むいくつかのヒト細胞株が、当該遺伝子の相同体を比較的強く発現していることが見出された。さらに鋭意研究したところ、ヒト由来のこの遺伝子は従来公知のいずれの遺伝子とも異なる塩基配列を含有する新規な遺伝子であることが確認された。また、従来公知の遺伝子との相同性について検討したところ、ヒト由来のこの遺伝子は、マウス由来のデザート・ヘッジホッグ遺伝子と極めて高い相同性を示すことが確認された。このことから、ヒト由来のこの遺伝子は、ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ遺伝子であると判断された。斯くして配列の確認された、ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ遺伝子

より得たDNAを、自律複製可能なベクターを用いて大腸菌に導入したところ、当該DNAが良好に発現してヒト由来のデザート・ヘッジホッグ蛋白質が得られることが確認された。

【0010】

別途、本発明者らは、従来公知のヒト由来のソニック・ヘッジホッグ蛋白質を組換えDNA技術により調製し、当該蛋白質を認識するモノクローナル抗体を調製した。斯くして得られたモノクローナル抗体は、ヒト由来のソニック・ヘッジホッグ蛋白質のみならず、上記の、ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ蛋白質をもよく認識することを確認した。この発明は、以上の知見に基づき完成されたものである。

【0011】

すなわち、この発明は、上記第一の課題を、ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ蛋白質により解決するものである。

【0012】

また、この発明は、上記第二の課題を、当該ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAにより解決するものである。

【0013】

また、この発明は、上記第三の課題を、当該ヘッジホッグ蛋白質を認識するモノクローナル抗体により解決するものである。

【0014】

また、この発明は、上記第四の課題を、当該ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAを発現させる工程と、生成したヘッジホッグ蛋白質を採取する工程とを含んでなるヘッジホッグ蛋白質の製造方法により解決するものである。

【0015】

また、この発明は、上記第五の課題を、当該ヘッジホッグ蛋白質を認識するモノクローナル抗体を用いて当該ヘッジホッグ蛋白質を検出する方法により解決するものである。

【0016】

【発明の実施の形態】

この発明は新規なヘッジホッグ蛋白質、とりわけ、ヒト由来の（以下、単に「ヒトの」ということもある。）デザート・ヘッジホッグ蛋白質に関するものである。当該蛋白質は、アミノ酸配列で、マウス由来の成熟型のデザート・ヘッジホッグ蛋白質と有意な相同性、通常は80%以上の相同性を示す。この発明のヘッジホッグ蛋白質は、例えば、配列表における配列番号1に示す、176個のアミノ酸残基よりなるアミノ酸配列を含有することがある。また、この発明でいうヘッジホッグ蛋白質とは、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列をそっくりそのまま有する蛋白質に加えて、当該アミノ酸配列に1又は複数のアミノ酸が付加した蛋白質、とりわけ、当該アミノ酸配列におけるN末端及び／又はC末端に1又は複数のアミノ酸が付加した、分子量35,000乃至50,000ダルトンの当該蛋白質の前駆体としての蛋白質や、当該アミノ酸配列におけるアミノ酸の1又は複数が欠失したアミノ酸配列を含有する蛋白質、当該アミノ酸配列におけるアミノ酸の1又は複数が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質、さらには、上述のごとき蛋白質に糖鎖が結合した蛋白質であっても、それが上述のようなアミノ酸配列を含有している限りこの発明に包含される。以上のようなこの発明のヘッジホッグ蛋白質の給源や調製方法は問わない。例えば、培養株化された細胞の培養物から得られる天然物としての当該蛋白質や、組換えDNA技術を適用して得られる当該蛋白質、さらには、ペプチド合成法を適用して得られる当該蛋白質であってもよい。

【0017】

この発明のDNAは、上述の如きヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAすべてを包含するものであり、その出所・由来は問わない。したがってこの発明のDNAは、それが当該ヘッジホッグ蛋白質をコードする限り、天然の給源から得られたDNAであっても、これを人為的に改変したり、化学合成したものであってもよい。すなわち、斯界においては、一般に、ある蛋白質をコードするDNAを人為的に発現させるに際し、そのDNAの発現効率を改善したり、あるいは、蛋白質そのものの生理活性や物性を改善する目的で、DNAにおける塩基の1又は複数を他の塩基で置換したり、DNAに適宜の塩基配列を連結することがある。この発明のDNAにおいても、斯かる変更は当然可能であり、具体的には、最終

的に得られる蛋白質が所期の機能を失わない範囲で、前述のごときこの発明の蛋白質をコードするDNAにおける5'末端及び／又は3'末端に適宜の制限酵素による認識部位、開始コドン、終止コドン、プロモーター、エンハンサーなどの塩基配列を連結し得ることは言うまでもない。したがって、この発明でいうDNAとは、前述のごとき蛋白質をコードするDNA、そのDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNA、さらには、それらのDNAがコードするアミノ酸配列を変更することなく、塩基の1又は複数を他の塩基で置換したDNAのすべてを包含することとなる。

【0018】

斯かるDNAを天然の給源から得るには、この発明で明らかにされた、ヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質、例えば、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列の少なくとも一部分をコードするDNAとの会合に基づいて、上皮細胞、内皮細胞、間質細胞、軟骨細胞、骨髄細胞、単球、顆粒球、リンパ球、神経細胞及びそれらを培養株化して得られるヒト由来の細胞を検索すればよい。細胞の検索には、例えば、PCR法、RT-PCR法、cDNAライブラリーのスクリーニング、ゲノミック・ライブラリーのスクリーニング及び／又はこれらの変法など、斯界において慣用の方法は、いずれも有利に適用することができる。望ましい細胞の具体例としては、造血系細胞などを培養株化して得られる、例えば、ARH-77(ATCC CRL 1621)、K-562(ATCC CCL 243)、KU-812(ケー・キシらが、『リユーケミア・リサーチ』、第9巻、381乃至390頁(1985年)に報告した樹立細胞株)などの株化細胞や骨髄細胞が挙げられる。斯くして得られるこの発明のDNAは、通常、配列表における配列番号2又は3に示す塩基配列を含有する。また、斯かる方法によれば、配列表における配列番号2又は3に示す塩基配列における5'末端及び／又は3'末端に1又は複数の塩基が付加した、鎖長1,000乃至3,000bpの、ヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質の前駆体をコードするDNAが得られる場合もある。斯かるDNAは通常の化学合成によっても得られ、いずれにしても、一旦DNAが入手されれば、これにPCR法を適用したり、自律複製可能なベクターを用いることなどにより、所望のレベルに容易に増幅することができる。

【0019】

この発明のDNAは、また、上述の如きヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAが自律複製可能なベクターに挿入されてなる組換えDNAとしての形態をも包含する。斯かる組換えDNAは、上述のように一旦目的とするDNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。この発明で用いるベクターとしては、例えば、pGEX-2T、pGEX-4T-1、pKK223-3、pcDNA1/Amp、BCMGsNeo、pcDL-SR α 、pKY4、pCDM8、pCEV4、pME18Sなどのプラスミドベクターが挙げられる。自律複製可能なベクターは、通常、プロモーター、エンハンサー、複製起点、転写終結部位、スプライシング配列及び／又は選択配列などの、この発明のDNAが個々の宿主において発現するための適宜塩基配列を含んでなる。なお、プロモーターとして、例えば、熱ショック蛋白質プロモーターや、あるいは、同じ特許出願人が特開平7-163368号公報に開示したインターフェロン- α プロモーターを用いるときには、形質転換体における当該DNAの発現を外部刺激により人為的に制御できることになる。

【0020】

斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯界において慣用の方法が用いられる。具体的には、先ず、この発明のDNAを含有する遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片を連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、AccI、BamHI、BstXI、EcoRI、HindIII、NotI、PstI、SacI、SalI、SmaI、SpeI、XbaI、XhoIなどを用いれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えDNAは、微生物や動物由来の宿主において無限に複製可能である。

【0021】

この発明のDNAは、さらに、適宜の宿主に導入されてなる形態のものをも包

含する。斯かる形態のDNAは、通常、上述の如きこの発明の組換えDNAを適宜の宿主に導入することにより形質転換体として容易に得ることができる。宿主としては、斯界において慣用される微生物及び動植物由来の細胞を用いることができる。微生物を宿主とする場合は、培養物当たりの当該蛋白質の産生量の多さの点で有用である。一方、哺乳類など動物に由来する細胞を宿主に用いる場合、生成される蛋白質が、天然物として得られる当該蛋白質の理化学的性質と実質的に同一か又は極めて同一に近いという点で有用である。宿主微生物としては、例えば、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母などはいずれも有利に用いることができる。哺乳類由来の宿主細胞の具体例としては、例えば、3T3細胞、C127細胞、CHO細胞、CV-1細胞、COS細胞、HeLa細胞、MOP細胞及びそれらの変異株を始めとする、ヒト、サル、マウス及びハムスター由来の上皮系細胞、間質系細胞及び造血系細胞が挙げられる。斯かる宿主にこの発明のDNAを導入するには、例えば、公知のDEAE-デキストラン法、磷酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、さらには、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどによるウイルス感染法などを用いればよい。形質転換体から当該蛋白質を産生するクローンを選択するには、形質転換体を培養培地で培養し、当該蛋白質の産生が観察されたクローンを選択すればよい。なお、以上に説明した組換えDNA技術については、例えば、黒木登志夫、谷口克、押村光雄編集、『実験医学別冊細胞工学ハンドブック』、1992年、羊土社発行や横田崇、新井賢一編集、『実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ3 遺伝子クローニング実験法』、1993年、羊土社発行などにも詳述されている。

【0022】

一方、斯界においては、所望のDNAが上述のようにして得られている場合、当該DNAを導入してなる、いわゆる、トランスジェニック動物やトランスジェニック植物を得ることは慣用となっている。この発明の、適宜の宿主に導入されたDNAには、斯かるトランスジェニック動物乃至トランスジェニック植物も包含される。トランスジェニック動物作製の概略を述べると、先ず、この発明のDNAを、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法や当該DNA

を含有する組換えウイルスの感染などにより、受精卵や胚性幹細胞に導入する。次に、このようにして得られる、当該DNAの導入された細胞を、偽妊娠雌動物の卵管内又は子宮内に移植する。その後、自然分娩や帝王切開などにより生まれる子の中から、ハイブリダイゼーション法やPCR法などを適用してこの発明のDNAが導入されてなるトランスジェニック動物を選択すればよい。また、DNAの導入に際して、この発明のヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAに加え、さらに、遺伝子の発現を、適宜の組織特異的及び／又は適宜の刺激特異的に制御することのできる適宜のプロモーターやエンハンサーなどや、シグナルペプチドをコードするDNAをさらに含んでなるDNAを、先に示した方法に準じて細胞に導入し、トランスジェニック動物を作製してもよい。斯くしてこの発明のDNAを導入してなるトランスジェニック動物を得ることができる。なお、以上述べた、トランスジェニック動物に関しては、例えば、村松正實、岡山博人、山本雅編集、『実験医学別冊 新 遺伝子工学ハンドブック』、1996年、羊土社発行、第269乃至283頁に、その手法が詳述されている。

【0023】

上述の、この発明のヘッジホッグ蛋白質は、当該ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAを発現させる工程と、当該工程により生成したヘッジホッグ蛋白質を採取する工程を含む工程により製造される。ここでいうDNAを発現させる工程には、例えば、先述のようにして得られる、当該ヘッジホッグ蛋白質をコードするこの発明のDNAを導入してなる形質転換体を培養する工程が含まれる。斯かる形質転換体の培養に用いる培地としては、用いる形質転換体に応じて慣用の培養培地を選択すればよく、斯かる培養培地は、通常、緩衝水を基材とし、これにナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、リンイオン、塩素イオンなどの無機イオンと、宿主の代謝能力に応じた微量元素、炭素源、窒素源、アミノ酸、ビタミンなどを加え、必要に応じて、さらに血清、ホルモン、細胞成長因子、細胞接着因子などを含有せしめて構成される。個々の炭素源としては、例えば、グルコース、果糖、蔗糖、澱粉、澱粉加水分解物などの糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキスの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。

【0024】

個々の培地としては、例えば、宿主が微生物の場合に用いる、Lブロス培地、Tブロス培地、TYブロス培地、ニュートリエント・ブロス培地、YMブロス培地、ポテト・デキストロース・ブロス培地などや、また、宿主が動物由来の細胞の場合に用いる、199培地、DMEM培地、Ham's F12培地、IMDM培地、MCDB104培地、MCDB153培地、MEM培地、RD培地、RITC80-7培地、RPMI-1630培地、RPMI-1640培地、WAJC404培地などが挙げられる。斯かる培養培地に形質転換体を約 1×10^4 乃至 1×10^7 個/ml、望ましくは、約 1×10^5 乃至 1×10^6 個/ml接種し、必要に応じて新鮮な培養培地と取替えながら、宿主に応じた条件で培養する。例えば、宿主が微生物の場合、培養温度25乃至65℃、pH5乃至8に保ちつつ、通気攪拌などによる好氣的条件下で約1乃至10日間培養すればよい。一方、宿主が動物由来の細胞の場合、温度37℃前後で1日乃至1週間、望ましくは、2乃至4日間浮遊培養又は単層培養すればよい。斯くして当該蛋白質を含む培養物が得られる。形質転換体の種類や培養条件にもよるが、斯くして得られる培養物は、通常、11当り、当該蛋白質を約1 μ g乃至100mg含む。

【0025】

また、この発明のヘッジホッグ蛋白質の製造方法における、DNAを発現させる工程には、例えば、当該ヘッジホッグ蛋白質を発現する細胞、具体的には、ヒト由来の樹立細胞株であるARH-77(ATCC CRL1621)、K-562(ATCC CCL243)、KU-812(ケー・キシらが、『リウケミア・リサーチ』、第9巻、381乃至390頁(1985年)に報告した樹立細胞株)などの株化細胞を培養する工程が含まれる場合もある。当該細胞を、それぞれに適した培養培地、例えば、199培地、DMEM培地、Ham's F12培地、IMDM培地、MCDB104培地、MCDB153培地、MEM培地、RD培地、RITC80-7培地、RPMI-1630培地、RPMI-1640培地、WAJC404培地などを用いて、先述の動物由来の細胞を宿主とする形質転換体の培養に準じて培養すれば、当該蛋白質を含む培養物を得ることができる。細胞の種類や培養条件にもよるが、斯くして得られる培養物は、通常

、11当り、当該蛋白質を約1ng乃至1mg含む。

【0026】

このようにして得られる培養物は、必要に応じて、超音波、細胞溶解酵素及び／又は界面活性剤により菌体又は細胞を破碎した後、濾過、遠心分離などにより当該蛋白質を菌体若しくは細胞又はそれらの破碎物から分離し、精製する。精製には菌体若しくは細胞又はそれらの破碎物を除去した培養物に、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの生理活性蛋白質を精製するための斯界における慣用の方法が適用され、必要に応じて、これらは適宜組合せて適用される。そして、最終使用形態に応じて、精製蛋白質を濃縮・凍結乾燥して液状又は固状にすればよい。なお、後に述べるモノクローナル抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーによるときには、高純度の当該蛋白質が最少の時間と労力で得られる。

【0027】

また、この発明のヘッジホッグ蛋白質の製造方法における、DNAを発現させる工程には、例えば、前述の当該ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAを、望ましくは、ヒト以外の動物や植物に導入して得られる、トランスジェニック動物又はトランスジェニック植物を生育させる工程が含まれる場合もある。すなわち、当該トランスジェニック動物乃至トランスジェニック植物を生育させ、必要に応じて適宜の刺激を与え、所望の組織・器官や、血液、乳、体液などを採取し、先述のこの発明のヘッジホッグ蛋白質の製造方法における精製手段を適用すれば、当該蛋白質を得ることができる。

【0028】

この発明のモノクローナル抗体とは、上述の如き、この発明のヘッジホッグ蛋白質を認識するモノクローナル抗体全般を包含するものであり、その出所・由来、クラスは問わない。この発明のモノクローナル抗体は、この発明のヘッジホッグ蛋白質又はその免疫原性フラグメント、さらには、従来公知の他のヘッジホッ

グ蛋白質又はその免疫原性フラグメントを免疫源として用いることにより得ることができる。具体的には、例えば、斯かる免疫原で免疫感作しておいた哺乳動物より採取した抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞とのハイブリドーマを作製し、これよりこの発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローンを選択し、これを生体内外で培養することにより得ることができる。

【0029】

免疫原となり得る蛋白質は、例えば、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列をコードするDNAの少なくとも一部分に相当するDNAを導入した形質転換体を培養することにより得ることができ、それらは、通常、完全精製又は部分精製した状態で使用される。免疫原性フラグメントを得るには、これら完全精製品又は部分精製品を化学的又は酵素的に分解するか、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列に基づきペプチド合成すればよい。また、従来公知のヘッジホッグ遺伝子やヘッジホッグ蛋白質に基づいてこれらの方法を適用しても、免疫原となりうる蛋白質を得ることができる。斯かる従来公知のヘッジホッグとして、ヒトのソニック・ヘッジホッグは有利に用いることができる。

【0030】

免疫感作は慣用の方法によればよく、例えば、上記のごとき抗原を単独又は適宜アジュバントとともに哺乳動物の静脈、皮内、皮下又は腹腔内に注射接種し、一定期間飼育する。哺乳動物に特に限定はなく、所期の抗体産生細胞が得られるかぎり、種類、大きさ、雌雄は問わない。通常はラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類が用いられ、後記無限増殖可能な哺乳類由来の細胞との適合性も勘案しながら、最適のものが選択される。用いる哺乳動物の種類や大きさにも依るが、抗原の接種量は、通常、総接種量を約5乃至500 μ g/匹とし、これを約1乃至2週間の間隔を置いて2乃至5回に分けて接種する。そして、最終接種から3乃至5日後に脾臓を摘出し、分散して抗体産生細胞としての脾細胞を得る。

【0031】

つぎに、斯くして得られた抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞とを融合させて、目的のハイブリドーマを含む細胞融合産物を得る。無限増殖可能

な哺乳類由来の細胞には、通常、P3-NS1-Ag4-1細胞(ATCC TIB18)、P3-X63-Ag8細胞(ATCC TIB9)及びSP2/O-Ag14細胞(ATCC CRL1581)などのマウス骨髓腫由来の細胞株又はその変異株が用いられる。細胞融合は、例えば、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスを始めとする融合促進剤や電気パルスによる慣用の方法が用いられ、一例を挙げると、融合促進剤を含む融合培地に抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳類由来の細胞を約1:1乃至1:10の割合で浮遊させ、この状態のまま、約30乃至40℃で約1乃至5分間インキュベートする。融合培地には、例えば、MEM培地、RPMI1640培地及びイスコフ改変ダルベコ培地を始めとする通常一般のものを用い得るが、ウシ血清などの血清類は除いておくのが望ましい。

【0032】

目的のハイブリドーマを選択するには、まず、上記のようにして得た細胞融合産物をHAT培地などの選択用培地に移し、約30乃至40℃で約3日乃至3週間培養してハイブリドーマ以外の細胞を死滅させる。つぎに、ハイブリドーマを常法により培養し、培養物中に分泌された抗体につき、当該蛋白質との反応性を試験する。試験には、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ及びバイオアッセイなどの抗体を検出するための慣用の方法が用いられ、例えば、富山朔二・安東民衛編『単クローン抗体実験マニュアル』、1991年、講談社サイエンティフィク発行、第105乃至152頁にはそのための方法が種々詳述されている。当該蛋白質を認識する抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法などにより、直ちにクローニングされ、単一クローン化されたこの発明によるハイブリドーマを得る。

【0033】

この発明のモノクローナル抗体は、斯かるハイブリドーマを生体内外で培養することにより得ることができる。培養には、哺乳類由来の細胞を培養するための慣用の方法が用いられ、例えば、生体外の培養培地で培養するときには、その培養物から、一方、ヒト以外の温血動物に移植して生体内で培養するときには、その腹水及び／又は血液からモノクローナル抗体を採取する。培養物又は腹水若し

くは血液からモノクローナル抗体を採取するには、抗体一般を精製するための斯界における慣用の方法が用いられる。個々の方法としては、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動が挙げられ、これらは必要に応じて組合せて適用される。精製したモノクローナル抗体は、その後、濃縮・乾燥し、用途に応じて液状又は固状とする。

【0034】

この発明のモノクローナル抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーによる当該ヘッジホッグ蛋白質の精製にきわめて有用である。斯かる精製方法は、この発明のモノクローナル抗体を当該蛋白質と当該蛋白質以外の夾雑蛋白質を始めとする夾雑物質との混合物に接触させてモノクローナル抗体に当該蛋白質のみを吸着させる工程と、吸着した蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなり、両工程は、通常、水性媒体中で行なわれる。この発明のモノクローナル抗体は、通常、ゲル状の水不溶性担体に結合した状態で用いられ、その水不溶性担体を円筒管などにカラム状に充填し、これに、例えば、形質転換体の培養液又はそれらの部分精製品を通液すると、実質的に当該蛋白質のみが水不溶性担体上のモノクローナル抗体に吸着する。吸着した蛋白質は、モノクローナル抗体周囲の水素イオン濃度を変えることにより、容易に脱着させることができ、例えば、IgGのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合は酸性側のpH、通常、pH2乃至3で、一方、IgMのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合はアルカリ側のpH、通常、pH10乃至11で脱着・溶出させる。この精製方法によるときには、当該ヘッジホッグ蛋白質を最少限の労力と時間で高度に精製できる。高度に精製された当該ヘッジホッグ蛋白質は、それに感受性を示す疾患の治療・予防に効果を発揮する。

【0035】

この発明のモノクローナル抗体は、当該蛋白質の検出を必要とする諸分野にも広範な用途を有する。すなわち、この発明のモノクローナル抗体にラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノア

ッセイを適用するときには、被検試料中の当該蛋白質を迅速且つ正確に定性又は定量分析することができる。斯かる分析において、この発明のモノクローナル抗体は、例えば、放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識して用いられる。この発明のモノクローナル抗体は当該蛋白質に特異的に反応し、免疫反応を呈するので、その免疫反応をこれら標識物質を指標に測定すれば、被検試料中のごく微量の当該蛋白質を精度良く検出することができる。標識イムノアッセイは、バイオアッセイと比較して、一度に数多くの被検試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なく済み、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。したがって、この発明による検出方法は、当該蛋白質を製造する際の工程管理や製品の品質管理、さらには当該蛋白質の検出による緒疾患の診断方法などにもきわめて有用である。なお、この発明はモノクローナル抗体の標識や標識アッセイそのものに係わるものではないので詳細な説明は省くが、例えば、ピー・ティッセン著、石川栄治訳『エンザイムイムノアッセイ』、1989年、東京化学同人発行、第196乃至348頁などにはそのための方法が種々詳述されている。

【0036】

ところで、先述の、この発明のヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAは、いわゆる、「遺伝子療法」にも有用である。すなわち、通常の遺伝子療法においては、この発明のDNAを、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルス由来のベクターに挿入するか、カチオニックポリマーや膜融合型リボソームなどのリボソームに包埋し、この状態でこの発明のヘッジホッグ蛋白質に感受性を有する疾患に罹患した患者に直接注入するか、あるいは、患者からリンパ球や骨髄細胞を採取し、生体外で導入した後、患者に自家移植するのである。斯くして、この発明のDNAは、例えば、ヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質に感受性を示す疾患の遺伝子療法に著効を発揮することとなる。なお、これらの遺伝子療法を実施するための一般的手順は、例えば、島田隆、斉藤泉、小澤敏也編集、『実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ 遺伝子治療の基礎技術』、1996年、羊土社発行にも詳述されている。

【0037】

以下、実施例を示して、この発明をより詳細に説明する。すなわち、実施例1乃至3によって、この発明のヘッジホッグ蛋白質、当該蛋白質をコードするDNA及び当該蛋白質の製造方法につき説明し、実施例4によって、この発明のモノクローナル抗体及びその製造方法につき説明し、さらに、実施例5乃至6によって、当該モノクローナル抗体を用いた蛋白質の検出方法につき説明する。

【0038】

【実施例1】

〈DNAの調製〉

【0039】

【実施例1-1】

〈全RNAの調製〉

常法にしたがって、ヒト形質細胞白血病由来の樹立細胞株ARH-77 (ATCC CRL1621) を10% (v/v) ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地 (pH7.2) に浮遊させ、培養規模を拡大しながら、5%CO₂ インキュベーター中で37℃で増殖させた。所期の細胞密度に達した時点で増殖細胞を採取した。微量遠心管中で磷酸食塩緩衝液 (以下、「PBS」と記す。) に細胞を懸濁し、遠心分離して上清を除去する操作を3回繰り返した後、細胞を、新たな微量遠心管一本当たり細胞数 5×10^6 個とり、バイオテクス社製のRNA調製用試薬『ウルトラスペックRNA』を1mlずつ添加し懸濁した。この懸濁物を氷上で5分間保持し、クロロホルム/ウルトラスペックRNA混液 (1:5、v/v) を微量遠心管当たり1.2ml添加し、15秒間攪拌後、氷上で5分間保持した。遠心分離して形成される上層を採取し、これと等量の2-プロパノールを添加・混合した後、氷上で5分間保持した。遠心して上清を除去し、沈澱を、75% (v/v) エタノール水溶液で2回洗浄し、減圧乾燥し、滅菌蒸留水に溶解して、ARH-77由来の全RNAを含む水溶液を得た。この水溶液を一部とり、260nmにおける吸光度を測定してRNA濃度を算出した。

【0040】

【実施例1-2】

〈第一ストランドcDNAの調製〉

先ず、ワイ・エシェラードらが報告し、米国国立予防衛生研究所作成の核酸データベース『GenBank』にアクセス番号『X76292』を付して登録されている、マウス由来のデザート・ヘッジホッグ遺伝子の塩基配列に基づき、5'-GCCAGGGTGTGAGCAACAGT-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを常法にしたがい調製した。このオリゴヌクレオチド2.5 pmolと、実施例1-1の方法で得た全RNA 1 μgとを微量遠心管にとり、滅菌蒸留水を添加して全量を15.5 μlとした。この微量遠心管を70℃で10分間保持した後、氷上で1分間保持し、ここに2.5 μlの10×PCR緩衝液、2.5 μlの25 mM MgCl₂、1.0 μlの10 mM dNTPミックス及び2.5 μlの0.1 M DTTの順にそれぞれ加え、混合後、42℃で1分間保持した。さらに、1 μlのストラタジーン製の逆転写酵素『スーパースクリプト II RT』を加え、混合後42℃で50分間保持し、第一ストランドcDNAを合成した。引き続き70℃で15分保持して逆転写酵素の反応を終結させた後、37℃にまで冷却し、1 μlのRNaseを加え37℃で30分間保持してRNAを消化した。次に、120 μlの6 M NaIを加え、さらに、ギブコ・ビー・アール・エル製の『グラス・マックス・スピン・カートリッジ』を用い、添付の説明書にしたがい操作して、精製された第一ストランドcDNAを含む水溶液50 μlを得た。

【0041】

【実施例1-3】

＜ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNA断片の調製＞

実施例1-2の方法で得た第一ストランドcDNAを含む水溶液10 μlを微量遠心管にとり、ギブコ・ビー・アール・エル製の、PCRの一変法である5' RACE実施用のキット『5' RACEシステム・バージョン2.0』を用いて、添付の説明書にしたがい操作して、この第一ストランドcDNAの5'末端部にCテイルを付加した後、cDNAの5'末端部分を含むDNA断片を増幅した。センスプライマーには『5' RACEシステム・バージョン2.0』に添付のアンカープライマーを、アンチセンスプライマーには実施例1-2の方法で得たオリゴヌクレオチドを用いた。温度制御は、94℃で1分間インキュベートの後

、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で1分間インキュベートするサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で10分間インキュベートした。反応液量は50 μ lとした。

【0042】

次に、この反応産物を鋳型に用い、通常のPCR法を適用して、ヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNA断片を調製した。まず、このPCR用のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、ワイ・エシェラードらが報告し、米国国立予防衛生研究所作成の核酸データベース『GenBank』にアクセス番号『X76292』を付して登録されている、マウス由来のデザート・ヘッジホッグ遺伝子の塩基配列に基づき、それぞれ、5'-TG TGCT GCTTGGCACTCTTG-3' 及び5'-CCGTGGCATTTCCC GGAAAG-3' で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを常法にしたがい調製した。次に、先に得た5' RACEの反応産物の100倍希釈液2 μ lを新たな微量遠心管にとり、ここに、3 μ lの10 \times PCR緩衝液、1.8 μ lの25mM MgCl₂、0.6 μ lの10mM dNTPミックス及びセンスプライマーとアンチセンスプライマーの適量と滅菌蒸留水を加えて全量を30 μ lとし、さらに0.3 μ lの5単位/ μ l Taq DNA ポリメラーゼを加えて、94℃で3分間インキュベートの後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で1分間インキュベートするサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で10分間インキュベートしてPCRを行った。得られたPCR産物を、2%アガロースゲル電気泳動法に供し、エチジウムブロマイドで染色された約600bpのバンドを含むゲルを切り出し、これに、宝酒造製のDNA精製用キット『Suprec-01』を適用してDNA断片を含む水溶液20 μ lを得た。

【0043】

【実施例1-4】

〈組換えDNAの調製〉

実施例1-3の方法で得たDNA断片を含む水溶液の一部をとり、ストラタジーン製『pCR-Script SK(+) クローニング・キット』を用い、添付の説明書にしたがい操作して、当該DNA断片とプラスミドベクター『pC

R-Script SK (+)』とを連結した。連結反応後、反応液の一部を、宝酒造製の大腸菌コンピテントセル『JM101』株に、常法により形質転換して導入した。これを、常法により調製した $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL寒天培地に接種し、 37°C で一晩静置培養した。形成されたコロニーのうちの数個を、それぞれ $10\mu\text{l}$ の滅菌蒸留水に懸濁した。鋳型として、この懸濁液を用いたこと以外は、すべて、実施例1-3に記載のPCRと同一の方法でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動で、鎖長約 600bp のDNAの確認されたコロニー1つを選択し、当該コロニーを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLブロス培地に接種し、 37°C で一晩振盪培養した。培養物に、通常のアルカリ-SDS法を適用して、組換えDNAを採取した。当該組換えDNAに、ジデオキシ法を適用して挿入されたDNA断片の塩基配列を分析したところ、この組換えDNAは、配列表における配列番号3に示す塩基配列を含んでいることが確認された。

【0044】

当該塩基配列と従来公知のDNAとの塩基配列の相同性を調べたところ、ワイ・エシェラードらが報告し、米国国立予防衛生研究所作成の核酸データベース『GenBank』にアクセス番号『X76292』を付して登録されている、マウス由来のデザート・ヘッジホッグ遺伝子の塩基配列と、約89%という極めて高い相同性を示すことが確認された。このことは、当該DNAはヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAであることを示している。この実施例1-4で得た組換えDNAを『pHuDHH/#20』と命名した。また、この実施例1-4で明らかにした、配列表における配列番号3に示す塩基配列と、エム・ハンマーシュミットら、『トレンズ・イン・ジェネティクス』、第13巻、14乃至21頁(1997年)などに記載されている、従来公知のヘッジホッグ蛋白質の構造と機能に関して得られている知見との比較により、配列表の配列番号3における第19乃至546番目の塩基配列が、ヒトの成熟型の、デザート・ヘッジホッグ蛋白質をコードしていることが確認された。

【0045】

【実施例2】

〈形質転換体の調製〉

先ず、実施例1-4の方法により確認された、ヒトの成熟型の、デザート・ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAの塩基配列に基づき、PCRに用いるセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、それぞれ、5'-CCCGGGAATTCATTGCGGGCCGGGCGGGGGCCG-3'及び5'-ACGATGAATTCTCAGCCCGCCCGCCCGGACCGCCA-3'で表されるオリゴヌクレオチドを、常法にしたがい調製した。実施例1-4の方法で得た、組換えDNA pHuDHH/#20を鋳型に用いることと、センスプライマー及びアンチセンスプライマーとして、この実施例2で調製したオリゴヌクレオチドを用いること以外は、すべて実施例1-3に記載のPCRと同一の方法によりPCRを行った。反応産物を2%アガロースゲル電気泳動に供し、宝酒造製のDNA精製キット『Suprec-01』を用い、添付の説明書にしたがって、PCRで増幅された約600bpのDNAを精製し、20μlの水溶液を得た。この水溶液2μlをとり、常法にしたがい、T4DNAリガーゼを用いて、インビトロジェン製プラスミドベクター『pCRII』と連結した。連結反応後、反応液の一部を、インビトロジェン製の大腸菌コンピテントセル『TOP10F'』株に、常法にしたがい形質転換して導入した。これを、常法により調製した、50μg/mlのアンピシリン及び5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシドを含むL寒天培地に接種し、37℃で一晩静置培養した。形成された白色のコロニーを、50μg/mlのアンピシリンを含むLブロス培地に接種し、37℃で一晩振盪培養し、培養物にアルカリ-SDS法を適用して、組換えDNAを調製した。当該組換えDNAを制限酵素EcoRIで切断した後、2%アガロースゲル電気泳動に供し、分離された約600bpのバンドを、宝酒造製『Suprec-01』を用いて精製した。

【0046】

この水溶液の一部をとり、常法にしたがい、T4DNAリガーゼを用いて、予めEcoRIで切断した後、脱リン酸化しておいたファルマシア製のプラスミドベクター『pGEX-2T』と連結した。予め、ファルマシア製の大腸菌『BL21株』に、ディー・エム・グローバー編、『DNAクローニング』、第1巻、

アイ・アール・エル・プレス発行（1985年）、109乃至136頁に記載の方法を適用して調製しておいたコンピテントセルに、連結反応後の反応液の一部を、常法にしたがい形質転換して導入した。これを、常法により調製した $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL寒天培地に接種し、 37°C で一晩静置培養した。形成されたコロニーのひとつを $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLブロス培地に接種し、 37°C で一晩振盪培養し、培養物にアルカリ-SDS法を適用して、組換えDNAを調製した。ジデオキシ法により分析したところ、当該組換えDNAは、配列表における配列番号2に示す塩基配列を含有していることが確認された。以上のようにして得た、組換えDNA及び当該組換えDNAが導入されてなる形質転換体を、それぞれ、『pHuDHH5' / pGEX-2T / #4-8』及び『TAL #4-8 / HuDHH』と命名した。図1に示しように、組換えDNA pHuDHH5' / pGEX-2T / #4-8においては、配列表における配列番号2に示すヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNAは、Tacプロモーターの下流に位置するグルタチオンS-トランスフェラーゼの構造遺伝子の下流に、この構造遺伝子と同じ読み枠で位置し、さらにその下流に終止コドンが位置していた。

【0047】

【実施例3】

〈ヘッジホッグ蛋白質の製造〉

実施例2の方法で得た形質転換体TAL #4-8 / HuDHHを、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLブロス培地で 37°C で一晩振盪培養して種培養液を得た。500ml容三角フラスコに新たに調製した同じ組成の培地100mlに、この種培養液を体積比で1%加え、培養液の600nmにおける吸光度を経時的に確認しながら 37°C で振盪培養し、吸光度が約0.5となった時点で、ここに100mM イソプロピルチオ- β -D-ガラクトシドを体積比で0.1%添加した。さらに 37°C での振盪培養を3時間半続けた後、培養物を遠心分離して菌体を採取した。菌体を、PBSで洗浄の後、新鮮な5mlのPBSに懸濁し、常法にしたがい、氷上で超音波処理して菌体を破碎した。菌体破碎物を遠心分離して上清を採取した。

【0048】

この上清を、ファルマシア製ビーズ『グルタチオン・セファロース4B・ビーズ』に添加し、室温で30分間インキュベートした。上清を遠心分離して除去した後、PBSを添加して遠心分離して上清を除去する操作を2回繰り返した。さらに、2.5mM CaCl_2 及び150mM塩化ナトリウムを含む50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を添加した後、基質蛋白質1mg当たり10単位の伊藤ハム製のトロンピンを加え、室温で16時間インキュベートした。遠心分離して上清を採取し、シグマ製『アンチトロンピン-アガロース』を加え、さらに遠心分離した。この上清を、予め1mM ジチオトレイトール及び0.2mMフェニルメチルスルフォニルフルオリドを含むPBS(以下、「平衡化緩衝液」と記す。)で平衡化しておいた、シグマ製『ヘパリン-アガロース』に加え、室温で30分間インキュベートした。平衡化緩衝液を添加し、遠心分離して上清を除去し、さらに、650mM 塩化ナトリウムを加え、遠心分離して上清を採取した。新鮮な650mM 塩化ナトリウムを加え、遠心分離して上清を採取する操作をさらに2回繰り返し、この3回の操作で採取された上清を合一した。

【0049】

合一された液の一部をとり、ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、第680乃至685頁(1970年)に報告している方法に準じ、還元剤の存在下でドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、「SDS-PAGE」と記す。)に供した。分子量マーカには、分子量14,400乃至97,400ダルトンの6種の蛋白質を含む、バイオラッド製の『SDS-PAGEスタンダードズ、ロー・レンジ』を用いた。その結果、分子量22,000 \pm 2,000ダルトンに相当する位置と、分子量18,000 \pm 2,000ダルトンに相当する位置に主たるバンドが観察された。対照例1として、形質転換体TAL#4-8/HuDHHに代えて大腸菌BL21株を用いたこと以外は、すべてこの実施例3と同一の方法で操作したところ、SDS-PAGEでは顕著なバンドは認められなかった。対照例2として、形質転換体TAL#4-8/HuDHHに代えて、大腸菌BL21株にプラスミドベクターpGEX-2Tを導入してなる形質転換体を用いたこと以外は、すべてこの実施例3と同一の方法

で操作したところ、SDS-PAGEでは顕著なバンドは認められなかった。

【0050】

配列表における配列番号2に併記したアミノ酸配列を有するヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質の計算上の分子量は19,747である。一方、この実施例3の方法にしたがい操作した場合、目的とする蛋白質はそのN末端部にGly-Ser-Pro-Gly-Ile-His-で表されるペプチドが付加された蛋白質として生成され、採取される。配列表における配列番号2に併記したアミノ酸配列に、このGly-Ser-Pro-Gly-Ile-His-なる配列のペプチドが付加された蛋白質の分子量は、20,296である。以上のことは、SDS-PAGEで分子量22,000 \pm 2,000ダルトンを示す、この実施例3の方法で得られる蛋白質が、配列表における配列番号2に併記したアミノ酸配列を含有する、この発明のヘッジホッグ蛋白質であることを示している。実施例3の方法で得られるもう一方の、SDS-PAGEで分子量18,000 \pm 2,000を示す蛋白質は、当該蛋白質が実施例3に示す方法にしたがい操作する過程で過分解を受けた分解産物と考えられる。以上の結果は、この発明の製造方法によれば、ヒトのデザートヘッジホッグ蛋白質を良好に製造できることを示している。

【0051】

【実施例4】

〈モノクローナル抗体の製造〉

【0052】

【実施例4-1】

〈免疫原の調製〉

【0053】

【実施例4-1(a)】

〈免疫原をコードするDNAを導入してなる形質転換体の調製〉

ヒト肺癌細胞由来の樹立細胞株A549(ATCC CCL185)を、常法にしたがって、10%(v/v)ウシ胎児血清を補足したRPMI-1640培地(pH7.2)に浮遊させ、培養規模を拡大しながら、5%CO₂インキュベ

ーター中で37℃で増殖させた。所期の細胞密度に達した時点で増殖細胞を採取した。この細胞を、実施例1-1に記載の『ウルトラスペックRNA』を用いる方法に準じて処理し、A549由来の全RNAを含む水溶液を得た。この全RNAに、通常のRT-PCR法を適用して、成熟型のヒトの、ソニック・ヘッジホッグ蛋白質をコードするDNA断片を増幅した。センスプライマー及びアンチセンスプライマーとしては、ヴィ・マリーゴらにより報告され、米国国立予防衛生研究所作成の核酸データベース『GenBank』に、アクセス番号『L38518』を付して登録されているヒトのソニック・ヘッジホッグ遺伝子の塩基配列に基づき、常法にしたがい化学合成して得た、それぞれ、5'-CCCGGGAATTCATTGCGGACCGGGCAGGGGGTT-3'及び5'-ACGATGAATTCTCAGCCTCCCGATTTGGCCGC-3'で表される塩基配列のオリゴヌクレオチドを用いた。増幅されたDNA断片は、RT-PCR産物に実施例1-3に記載の『Suprec-01』を用いる方法を適用して採取した。実施例2に記載の方法に準じて、このDNA断片をプラスミドベクター『pCRII』に連結し、大腸菌コンピテントセル『TOP10F'』株に導入し、得られる形質転換体を培養し、培養物にアルカリ-SDS法を適用して組換えDNAを得た。ジデオキシ法により分析し、この組換えDNAが、配列表における配列番号4に示した、ヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質の成熟型をコードする塩基配列を含有していることを確認した。

【0054】

実施例2に記載の方法に準じて、この組換えDNAの一部をとり、制限酵素EcoRIで切断して生成する約600bpのDNAを、『Suprec-01』を用いる方法により採取し、プラスミドベクター『pGEX-2T』と連結し、大腸菌コンピテントセル『BL21』株に導入し、得られる形質転換体を培養し、培養物にアルカリ-SDS法を適用して組換えDNAを得た。ジデオキシ法により分析し、当該組換えDNAが、Tacプロモーターの下流に位置するグルタチオンS-トランスフェラーゼの構造遺伝子の下流に、この構造遺伝子と同じ読み枠で、配列表における配列番号4に示す塩基配列のDNAを含み、さらにその下流に、同じ読み枠で終止コドンを含んでいることを確認した。以上のようにし

て得た、組換えDNA及び、当該組換えDNAが導入されてなる形質転換体を、それぞれ、『pHuSHH/pGEX-2T/#3-1』及び『TAL#3-1/HuSHH』と命名した。

【0055】

【実施例4-1(b)】

〈形質転換体による免疫原の調製〉

実施例3に記載の方法に準じて、実施例4-1(a)の方法で得た形質転換体TAL#3-1/HuSHHを培養し、菌体を採取し、菌体破砕物の上清を得た。引き続き、この上清に、『グルタチオン・セファロース4B・ビーズ』、トロンビン、『アンチトロンビン-アガロース』、及び『ヘパリン-アガロース』を用いる実施例3に記載の方法を適用して、形質転換体TAL#3-1/HuSHHに由来する蛋白質を含む水溶液を得、SDS-PAGEにより分析した。その結果、分子量 $22,000 \pm 2,000$ ダルトンに相当する位置に主たるバンドが確認された。配列表における配列番号4に併記した、ヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質の成熟型の計算上の分子量は19,560である。一方、この実施例4-1(b)の方法によれば、目的とする蛋白質は、そのN末端部にGly-Ser-Pro-Gly-Ile-His-で表されるペプチドが付加された蛋白質として生成され、採取される。以上のことは、この実施例4-1(b)で得た蛋白質が、ヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質であり、純度よく精製されていることを示している。以上のようにして、免疫原としての、ヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質の精製標品を得た。

【0056】

【実施例4-2】

〈ハイブリドーマの調製〉

7週齢のBALB/cマウスのメスの腹腔内に、実施例4-1(b)の方法により得た、ヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質の精製標品を完全フロイントアジュバントとともに $100 \mu\text{g}$ /匹の割合で注射接種した。2週間後、同様に同一量を接種し、さらに、不完全フロイントアジュバントの注射接種を、1週間間隔で3回繰り返した。最後の接種から4日後に脾臓を摘出し、分散して脾細

胞を得た。

【0057】

この脾細胞とマウス骨髓腫由来のSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)を37℃に予温しておいた血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)にそれぞれ細胞密度 3×10^4 個/ml及び 1×10^4 個/mlになるように浮遊させ、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱に平均分子量1,500ダルトンの50%(w/v)ポリエチレングリコールを含む血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)1mlを1分間かけて滴々加え、37℃で1分間インキュベートした後、全量が50mlになるまで血清無含有のRPMI1640培地(pH7.2)を滴々加え、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱をHAT培地に浮遊させ、96ウェルマイクロプレートに200 μ l/ウェルずつ分注し、37℃で1週間インキュベートしてハイブリドーマを選択した。

【0058】

各ウェルにおける培養上清中に分泌された抗体につき、実施例4-1(b)の方法により得たソニック・ヘッジホッグ蛋白質との反応性を、エンザイム・イムノアッセイにより調べ、当該蛋白質に反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選別した。選別されたハイブリドーマの培養上清中に分泌された抗体につき、さらに、実施例3の方法により得た、この発明の、デザート・ヘッジホッグ蛋白質との反応性を、同じくエンザイム・イムノアッセイにより調べ、当該蛋白質にも反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選別した。引続き、このハイブリドーマに常法にしたがって限界希釈を繰返し適用し、この発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローン『SH2-3』、『SH2-21』及び『SH2-260』を得た。

【0059】

【実施例4-3】

〈モノクローナル抗体の製造〉

実施例4-2の方法により得たハイブリドーマSH2-3、SH2-21及びSH2-260を、それぞれ別個に、細胞密度約 1×10^6 個/mlになるように5%(v/v)ウシ血清を補足したRPMI1640培地(pH7.2)に浮

遊させ、培養規模を拡大しながら、5%CO₂ インキュベータ中、37℃で培養した。所期の細胞密度に達した時点で、当該ハイブリドーマを、それぞれ、予めプリスタンで0.5ml/匹腹腔内注射しておいた8週齢のBALB/cマウスの腹腔内に1×10⁷個/匹注射接種し、通常の方法で1週間飼育した。

【0060】

それぞれのマウスから腹水を採取し、PBSで3倍希釈した後、硫酸アンモニウムを50%飽和になるように加え、4℃で24時間静置し、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱を20mM磷酸二水素カリウム水溶液(pH6.7)に対して4℃で一晩透析した後、予め新鮮な同一水溶液で平衡化しておいたヒドロキシアパタイトカラムに負荷し、濃度が20mMから300mMに直線的に上昇する磷酸二水素カリウム水溶液(pH6.7)を通液したところ、この発明のモノクローナル抗体『SH2-3mAb』、『SH2-21mAb』及び『SH2-260mAb』を含む水溶液が、それぞれ得られた。収量は、マウス1匹当たり、いずれも約5mgであった。常法にしたがって分析したところ、これらのモノクローナル抗体はいずれもIgG₁のクラスに属していた。

【0061】

【実施例5】

〈ウエスタン・ブロッティング〉

実施例3の方法により得たデザート・ヘッジホッグ蛋白質1μgを、常法にしたがい、還元剤存在下、ゲル濃度15%のSDS-PAGEに供した。これと並行して、実施例4-1(b)の方法により得たソニック・ヘッジホッグ蛋白質50ngを、常法にしたがい、還元剤存在下、ゲル濃度13%のSDS-PAGEに供した。常法にしたがって、泳動されたゲル中の蛋白質をニトロセルロース膜上に移取った後、続いてこのニトロセルロース膜を、大日本製薬製の固定化剤『ブロックエース』の原液に30分間浸してブロッキングを行った。実施例4-3の方法により得たモノクローナル抗体SH2-3mAb、大日本製薬製固定化剤『ブロックエース』及びツイーン20を、それぞれ20μg/ml、10%(v/v)及び0.1%(v/v)の濃度で含むPBSに1時間浸漬した後、0.1%(v/v)ツイーン20を含むPBSで洗浄して過剰の抗体を除いた。ニトロ

セルロース膜を西洋ワサビパーオキシダーゼで標識したヒツジ由来の抗マウスイムノグロブリン抗体を0.1% (v/v) と、10% (v/v) ブロックエース及び0.05% (v/v) ツイーン20をそれぞれ含むPBSに1時間浸漬して反応させ、0.1% (v/v) ツイーン20を含むPBSにより洗浄した後、アマシャム製染色キット『ECL kit』を用いて発色させた。なお、分子量マーカーには、分子量14,400乃至97,400ダルトンの6種の蛋白質を含む、バイオラッド製の『SDS-PAGEスタンダーズ、ロー・レンジ』を用いた。結果を図2に示す。

【0062】

図2のレーン1における、分子量 $22,000 \pm 2,000$ ダルトンに位置するバンドがこの発明のヘッジホッグ蛋白質である。分子量 $18,000 \pm 2,000$ ダルトンに位置するバンドは、実施例3に示す方法にしたがい操作する過程で当該蛋白質が過分解を受けた分解産物である。図2のレーン2における分子量 $22,000 \pm 2,000$ ダルトンに位置するバンドは、実施例4-1(b)に示す方法により得られるヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質である。

【0063】

次に、モノクローナル抗体SH2-3mAbに代えて、実施例3-1の方法により得たモノクローナル抗体SH2-21mAbを用いること以外は、すべてこの実施例5と同一の方法でウエスタン・ブロッティングを実施したところ、図2と同様の結果を得た。以上の結果は、この発明のモノクローナル抗体がヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質のみならず、ヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質をもよく認識することを示している。

【0064】

【実施例6】

〈エンザイム・イムノアッセイ〉

実施例4-3の方法により得たモノクローナル抗体SH2-3mAb及びSH2-260mAbを抗体濃度として各々 $10 \mu\text{g/ml}$ となるようにPBSで希釈した混合容液を、96ウェルマイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。マイクロプレートを室温で1時間以上インキュベートした後、溶液を除き

、1% (w/v) ウシ血清アルブミンを含むPBSを200 μ l/ウェルずつ加え、4℃で一晩静置した。別途、実施例3の方法により得たデザート・ヘッジホッグ蛋白質と、実施例4-1 (b)の方法により得たソニック・ヘッジホッグ蛋白質とを、それぞれ別個に、0.5% (w/v) ウシ血清アルブミンを含むPBSにより適宜濃度に希釈した。マイクロプレート中の液を除き、先に調製しておいた、いずれかの濃度のいずれかのヘッジホッグ蛋白質溶液をそれぞれ100 μ l/ウェルずつ加え、室温で1時間反応させた。0.05% (v/v) ツイーン20を含むPBSで洗浄後、ウサギ抗ヘッジホッグ抗血清のPBSによる500倍希釈液を100 μ l/ウェルずつ加えた。ここで用いたウサギ抗ヘッジホッグ抗血清は、実施例4-1 (b)の方法により得たソニック・ヘッジホッグ蛋白質で、常法にしたがいウサギを免疫感作した後、さらに常法にしたがい血液を採取し血清を分離することにより得た。

【0065】

抗血清と1時間反応させた後マイクロプレートを0.05% (v/v) ツイーン20を含むPBSで洗浄し、アマシャム製の西洋ワサビパーオキシダーゼで標識したロバ抗ウサギ抗体の、PBSによる1000倍希釈液を100 μ l/ウェルずつ加え、室温でさらに1時間反応させた。0.05% (v/v) ツイーン20を含むPBSで洗浄後、常法にしたがい、基質溶液としてo-フェニレンジアミンに過酸化水素水を加えた溶液を100 μ l/ウェルずつ加え、室温で15分間インキュベートし、2N H_2SO_4 を加えて反応を停止し、発色を波長492 nmにおける吸光度として測定した。結果を図3に示す。

【0066】

図3に示す結果は、この発明の検出方法によれば、ヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質のみならず、ヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質をも精度よく検出し得ることを示している。

【0067】

【発明の効果】

以上説明したとおり、この発明は、新規なヘッジホッグ蛋白質、すなわち、ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ蛋白質の発見に基づくものである。この発明の

ヘッジホッグ蛋白質は、当該蛋白質を認識するモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマの樹立に有用である。また、この発明のヘッジホッグ蛋白質は、当該蛋白質に感受性を示す諸疾患の治療・予防に効果を発揮する。この発明のモノクローナル抗体は、ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ蛋白質を認識するので当該蛋白質の精製・検出に有用である。また、この発明のモノクローナル抗体は、当該ヘッジホッグ蛋白質の生体内での過剰な産生に伴う種々の疾患の治療・予防・診断に効果を発揮する。さらに、これら効果に加え、この発明の蛋白質、DNA及びモノクローナル抗体は、ヒトの先天的形態異常の発症機序の解明に極めて有用である。この発明の製造方法によれば、当該蛋白質を極めて良好に得ることができる。

【0068】

この発明は斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると言える。

【0069】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：176

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

Cys	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Pro	Val	Gly	Arg	Arg	Arg	Tyr	Ala	Arg	lys
1				5				10						15	
Gln	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Tyr	Lys	Gln	Phe	Val	Pro	Gly	Val	Pro	Glu
			20					25					30		
Arg	Thr	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Pro	Ala	Glu	Gly	Arg	Val	Ala	Arg	Gly
		35					40				45				
Ser	Glu	Arg	Phe	Arg	Asp	Leu	Val	Pro	Asn	Tyr	Asn	Pro	Asp	Ile	Ile
	50					55				60					
Phe	Lys	Asp	Glu	Glu	Asn	Ser	Gly	Ala	Asp	Arg	Leu	Met	Thr	Glu	Arg
65				70						75				80	
Cys	Lys	Glu	Arg	Val	Asn	Ala	Leu	Ala	Ile	Ala	Val	Met	Asn	Met	Trp
			85					90					95		
Pro	Gly	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Gly	Trp	Asp	Glu	Asp	Gly	His
		100						105					110		
His	Ala	Gln	Asp	Ser	Leu	His	Tyr	Glu	Gly	Arg	Ala	Leu	Asp	Ile	Thr
		115						120					125		
Thr	Ser	Asp	Arg	Asp	Arg	Asn	Lys	Tyr	Gly	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Ala
	130					135					140				
Val	Glu	Ala	Gly	Phe	Asp	Trp	Val	Tyr	Tyr	Glu	Ser	Arg	Asn	His	Ile
145				150						155				160	
His	Val	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Asn	Ser	Leu	Ala	Val	Arg	Ala	Gly	Gly

165

170

175

【0070】

配列番号：2

配列の長さ：528

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：1..528

特徴を決定した方法：S

配列

TGC GGG CCG GGC CGG GGG CCG GTT GGC CGG CGC CGC TAT GCG CGC AAG	48
Cys Gly Pro Gly Arg Gly Pro Val Gly Arg Arg Arg Tyr Ala Arg lys	
1 5 10 15	
CAG CTC GTG CCG CTA CTC TAC AAG CAA TTT GTG CCC GGC GTG CCA GAG	96
Gln Leu Val Pro Leu Leu Tyr Lys Gln Phe Val Pro Gly Val Pro Glu	
20 25 30	
CGG ACC CTG GGC GCC AGT GGG CCA GCG GAG GGG AGG GTG GCA AGG GGC	144
Arg Thr Leu Gly Ala Ser Gly Pro Ala Glu Gly Arg Val Ala Arg Gly	
35 40 45	
TCC GAG CGC TTC CGG GAC CTC GTG CCC AAC TAC AAC CCC GAC ATC ATC	192
Ser Glu Arg Phe Arg Asp Leu Val Pro Asn Tyr Asn Pro Asp Ile Ile	
50 55 60	
TTC AAG GAT GAG GAG AAC AGT GGA GCC GAC CGC CTG ATG ACC GAA CGT	240
Phe Lys Asp Glu Glu Asn Ser Gly Ala Asp Arg Leu Met Thr Glu Arg	
65 70 75 80	
TGT AAG GAA CGG GTG AAC GCT TTG GCC ATT GCC GTG ATG AAC ATG TGG	288

Cys Lys Glu Arg Val Asn Ala Leu Ala Ile Ala Val Met Asn Met Trp	
85	90
CCC GGA GTG CGC CTA CGA GTG ACT GAG GGC TGG GAC GAG GAC GGC CAC	336
Pro Gly Val Arg Leu Arg Val Thr Glu Gly Trp Asp Glu Asp Gly His	
100	105
CAC GCT CAG GAT TCA CTC CAC TAC GAA GGC CGT GCT TTG GAC ATC ACT	384
His Ala Gln Asp Ser Leu His Tyr Glu Gly Arg Ala Leu Asp Ile Thr	
115	120
ACG TCT GAC CGC GAC CGC AAC AAG TAT GGG TTG CTG GCG CGC CTC GCA	432
Thr Ser Asp Arg Asp Arg Asn Lys Tyr Gly Leu Leu Ala Arg Leu Ala	
130	135
GTG GAA GCC GGC TTC GAC TGG GTC TAC TAC GAG TCC CGC AAC CAC ATC	480
Val Glu Ala Gly Phe Asp Trp Val Tyr Tyr Glu Ser Arg Asn His Ile	
145	150
CAC GTG TCG GTC AAA GCT GAT AAC TCA CTG GCG GTC CGG GCG GGC GGC	528
His Val Ser Val Lys Ala Asp Asn Ser Leu Ala Val Arg Ala Gly Gly	
165	170
	175

【0071】

配列番号：3

配列の長さ：548

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

株名：ARH-77 (ATCC CRL1621)

配列の特徴

特徴を表す記号：leader peptide

存在位置：1..18

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：19..546

特徴を決定した方法：S

配列

GCG CTG CCA GCC CAG AGC TGC GGG CCG GGC CGG GGG CCG GTT GGC CGG	48
Ala Leu Pro Ala Gln Ser Cys Gly Pro Gly Arg Gly Pro Val Gly Arg	
-5 1 5 10	
CGC CGC TAT GCG CGC AAG CAG CTC GTG CCG CTA CTC TAC AAG CAA TTT	96
Arg Arg Tyr Ala Arg lys Gln Leu Val Pro Leu Leu Tyr Lys Gln Phe	
15 20 25	
GTG CCC GGC GTG CCA GAG CGG ACC CTG GGC GCC AGT GGG CCA GCG GAG	144
Val Pro Gly Val Pro Glu Arg Thr Leu Gly Ala Ser Gly Pro Ala Glu	
30 35 40	
GGG AGG GTG GCA AGG GGC TCC GAG CGC TTC CGG GAC CTC GTG CCC AAC	192
Gly Arg Val Ala Arg Gly Ser Glu Arg Phe Arg Asp Leu Val Pro Asn	
45 50 55	
TAC AAC CCC GAC ATC ATC TTC AAG GAT GAG GAG AAC AGT GGA GCC GAC	240
Tyr Asn Pro Asp Ile Ile Phe Lys Asp Glu Glu Asn Ser Gly Ala Asp	
60 65 70	
CGC CTG ATG ACC GAA CGT TGT AAG GAA CGG GTG AAC GCT TTG GCC ATT	288
Arg Leu Met Thr Glu Arg Cys Lys Glu Arg Val Asn Ala Leu Ala Ile	
75 80 85 90	
GCC GTG ATG AAC ATG TGG CCC GGA GTG CGC CTA CGA GTG ACT GAG GGC	336
Ala Val Met Asn Met Trp Pro Gly Val Arg Leu Arg Val Thr Glu Gly	
95 100 105	
TGG GAC GAG GAC GGC CAC CAC GCT CAG GAT TCA CTC CAC TAC GAA GGC	384
Trp Asp Glu Asp Gly His His Ala Gln Asp Ser Leu His Tyr Glu Gly	

110	115	120	
CGT GCT TTG GAC ATC ACT ACG TCT GAC CGC GAC CGC AAC AAG TAT GGG			432
Arg Ala Leu Asp Ile Thr Thr Ser Asp Arg Asp Arg Asn Lys Tyr Gly			
125	130	135	
TTG CTG GCG CGC CTC GCA GTG GAA GCC GGC TTC GAC TGG GTC TAC TAC			480
Leu Leu Ala Arg Leu Ala Val Glu Ala Gly Phe Asp Trp Val Tyr Tyr			
140	145	150	
GAG TCC CGC AAC CAC ATC CAC GTG TCG GTC AAA GCT GAT AAC TCA CTG			528
Glu Ser Arg Asn His Ile His Val Ser Val Lys Ala Asp Asn Ser Leu			
155	160	165	170
GCG GTC CGG GCG GGC GGC TG			548
Ala Val Arg Ala Gly Gly			

175

【0072】

配列番号：4

配列の長さ：522

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

株名：A549 (ATCC CCL185)

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：1..522

特徴を決定した方法：S

配列

TGC GGA CCG GGC AGG GGG TTC GGG AAA AGG AGG CAC CCC AAA AAG CTG 48

Cys Gly Pro Gly Arg Gly Phe Gly Lys Arg Arg His Pro Lys Lys Leu	
1 5 10 15	
ACC CCT TTA GCC TAC AAG CAG TTT ATC CCC AAT GTG GCC GAA AAG ACC	96
Thr Pro Leu Ala Tyr Lys Gln Phe Ile Pro Asn Val Ala Glu Lys Thr	
20 25 30	
CTA GGC GCC AGC GGA AGG TAT GAA GGG AAG ATC TCC AGA AAC TCC GAG	144
Leu Gly Ala Ser Gly Arg Tyr Glu Gly Lys Ile Ser Arg Asn Ser Glu	
35 40 45	
CGA TTT AAG GAA CTC ACC CCC AAT TAC AAC CCC GAC ATC ATA TTT AAG	192
Arg Phe Lys Glu Leu Thr Pro Asn Tyr Asn Pro Asp Ile Ile Phe Lys	
50 55 60	
GAT GAA GAA AAC ACC GGA GCG GAC AGG CTG ATG ACT CAG AGG TGT AAG	240
Asp Glu Glu Asn Thr Gly Ala Asp Arg Leu Met Thr Gln Arg Cys Lys	
65 70 75 80	
GAC AAG TTG AAC GCT TTG GCC ATC TCG GTG ATG AAC CAG TGG CCA GGA	288
Asp Lys Leu Asn Ala Leu Ala Ile Ser Val Met Asn Gln Trp Pro Gly	
85 90 95	
GTG AAA CTG CGG GTG ACC GAG GGC TGG GAC GAA GAT GGC CAC CAC TCA	336
Val Lys Leu Arg Val Thr Glu Gly Trp Asp Glu Asp Gly His His Ser	
100 105 110	
GAG GAG TCT CTG CAC TAC GAG GGC CGC GCA GTG GAC ATC ACC ACG TCT	384
Glu Glu Ser Leu His Tyr Glu Gly Arg Ala Val Asp Ile Thr Thr Ser	
115 120 125	
GAC CGC GAC CGC AGC AAG TAC GGC ATG CTG GCC CGC CTG GCG GTG GAG	432
Asp Arg Asp Arg Ser Lys Tyr Gly Met Leu Ala Arg Leu Ala Val Glu	
130 135 140	
GCC GGC TTC GAC TGG GTG TAC TAC GAG TCC AAG GCA CAT ATC CAC TGC	480
Ala Gly Phe Asp Trp Val Tyr Tyr Glu Ser Lys Ala His Ile His Cys	
145 150 155 160	

TCG GTG AAA GCA GAG AAC TCG GTG GCG GCC AAA TCG GGA GGC

522

Ser Val Lys Ala Glu Asn Ser Val Ala Ala Lys Ser Gly Gly

165

170

174

【図面の簡単な説明】

【図1】

この発明の組換えDNA pHuDHH/pGEX-2T/#4-8の制限酵素地図を示す図である。

【図2】

この発明のモノクローナル抗体を用いる蛋白質の検出方法であるウエスタンブロッティング法により可視化した、ディスプレイ上に表示したゲル電気泳動像の中間調画像である。

【図3】

この発明のモノクローナル抗体を用いる蛋白質の検出方法であるエンザイム・イムノアッセイによる、ヘッジホッグ蛋白質の検出結果を示す図である。

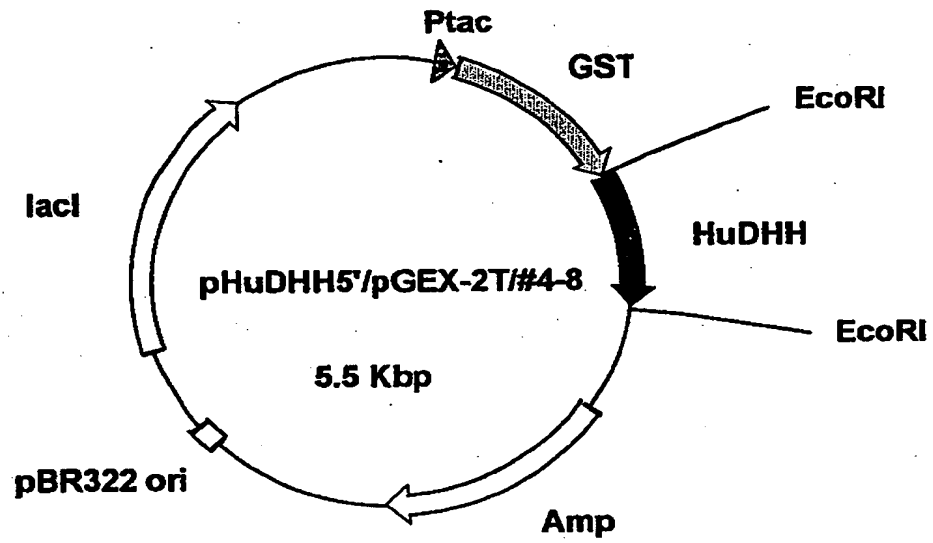
【符号の説明】

HuDHH	この発明の蛋白質をコードするDNA
Amp	アンピシリン耐性遺伝子
pBR322ori	大腸菌における複製開始点
GST	グルタチオンS-トランスフェラーゼ構造遺伝子
Ptac	Tacプロモーター

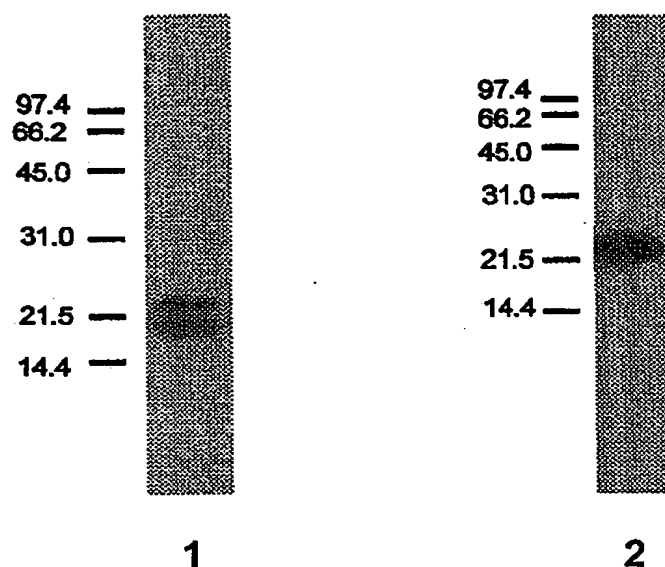
【書類名】

図面

【図1】



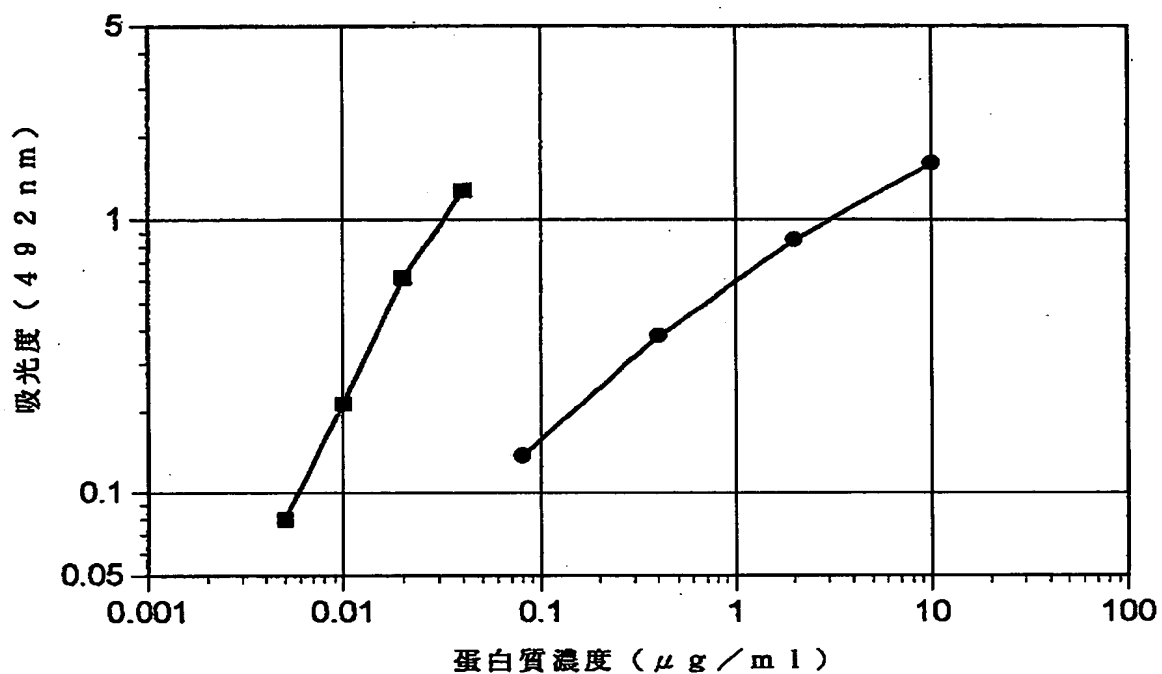
【図2】



註) 図の下の数字は、レーン番号を表している。レーン1及び2には、それぞれ、ヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質及びヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質が泳動されている。

図の左の数字は、分子量マーカーの分子量(単位、キログルトン)と、それぞれの移動位置を表している。

【図3】



註) 図中●及び■は、それぞれ、ヒトのデザート・ヘッジホッグ蛋白質及びヒトのソニック・ヘッジホッグ蛋白質の検出結果を表す。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なヘッジホッグ蛋白質、当該蛋白質をコードするDNA、当該蛋白質を認識するモノクローナル抗体、当該蛋白質の製造方法ならびに、当該蛋白質の検出方法を提供する。

【解決手段】 ヒト由来のデザート・ヘッジホッグ蛋白質、当該蛋白質をコードするDNA、当該蛋白質を認識するモノクローナル抗体、当該蛋白質の製造方法ならびに、当該蛋白質を認識するモノクローナル抗体を用いる蛋白質の検出方法により解決する。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000155908

【住所又は居所】

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

【氏名又は名称】

株式会社林原生物化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000155908]

1. 変更年月日 1990年 8月31日

[変更理由] 新規登録

住 所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
氏 名 株式会社林原生物化学研究所